

浴槽水およびプール水からの レジオネラ属菌検出後の対応における遺伝子検査法の実施結果 (平成23年度～平成25年度)

武藤 千恵子^a, 石上 武^a, 楠 くみ子^a, 市川 めぐみ^a,
辻 麻美^a, 田部井 由紀子^a, 保坂 三継^a, 中江 大^b

東京都では条例により、浴槽水及びプール水からレジオネラ属菌は検出されないこととしている。ここでいう「検出されないこと」とは「10 CFU/100 mL未満」として運用されており、これを超えた場合は施設に対して改善指導を行い、改善措置後の行政による再検査の結果でレジオネラ属菌が検出されないことを確認し、改善措置完了としている。しかしながら、レジオネラ属菌は培養によって確定するまでに7～14日ほどかかるため、改善措置後の再検査結果判定まで時間を要する。そこで、東京都では再検査時にLAMP法による遺伝子検査を導入し、レジオネラ属菌の遺伝子陰性の場合には速やかに設備の使用を再開させている。

平成23年度から25年度において、東京都健康安全研究センターに搬入された再検査検体の浴槽水計150検体、プール水計17検体、合計167検体について調査したところ、遺伝子検査結果が陰性であった浴槽水92検体(61.3%)及びプール水10検体(58.8%)はすべて「検出されないこと」に該当した。それにともない、通常7～14日かかる培養法の結果を待たずに、保健所は早期に施設の使用を再開させることができた。一方、遺伝子検査結果が陽性となった浴槽水58検体中49検体(84.5%)及びプール水7検体のすべでも、培養法で10 CFU/100 mL未満であり、「検出されないこと」に該当するものであった。したがって、遺伝子検査によるレジオネラ属菌陽性の場合には条例の運用上の整合性から十分慎重な対応が必要であると考えられる。

キーワード: レジオネラ属菌, 浴槽水, プール水, LAMP法,

はじめに

東京都ではレジオネラ症を未然に防止するため、浴槽水およびプール水に関する各条例等、すなわち、公衆浴場の設置場所の配置及び衛生措置等の基準に関する条例¹⁾、旅館業法施行条例²⁾およびプール等取締条例施行規則³⁾において、レジオネラ属菌は「検出されないこと」としている。ここでいう「検出されないこと」とは「10 CFU/100 mL未満」として運用されており、この基準を超えた場合には施設に対して改善指導を行っている。

また、改善指導後の行政による再検査については、東京都福祉保健局健康安全部長通知によって指導等の要綱が制定されており⁴⁾、その中で、指導した営業施設等から改善措置を実施した旨の連絡を受けたときは、立入検査を実施するとともに培養法及び遺伝子検査法によるレジオネラ属菌の行政検査を行うこと、改善措置後の行政による水質検査でレジオネラ属菌が検出されないことを確認した場合に、当該系統の浴槽等の使用再開を認めることと定められている。

しかしながら、レジオネラは培養法によって確定するまでに7～14日ほどかかるため、改善措置後の再検査結果判

定まで時間を要してしまう。そのため、再検査に遺伝子検査を導入することで、速やかなレジオネラ陰性の判定を図っている。本報では平成23年度～平成25年度の3か年の再検査におけるこれらの結果について、報告する。

材料と方法

1. 試料水

改善措置後の再検査検体として東京都健康安全研究センター(以下、当センター)に搬入された浴槽水計150検体(平成23年度41検体、平成24年度55検体、平成25年度54検体)、プール水計17検体(平成23年度6検体、平成24年度5検体、平成25年度6検体)、合計167検体を検査した。

2. 試験方法

培養法は、図1に示した。すなわち、試料水1,000 mLを孔径0.22 μmの滅菌メンブランフィルターで吸引ろ過し、フィルター上の捕捉物を滅菌精製水5 mLで1分間洗い出した後、0.2 M HCl-KCl溶液(pH2.2) 5 mLを添加して3～5分間酸処理を行った。この酸処理済み液をWYO α寒天培地(栄研化学)2枚とGVPC α寒天培地(日研生物医学研究

^a 東京都健康安全研究センター薬事環境科学部環境衛生研究科
169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1

^b 東京都健康安全研究センター薬事環境科学部

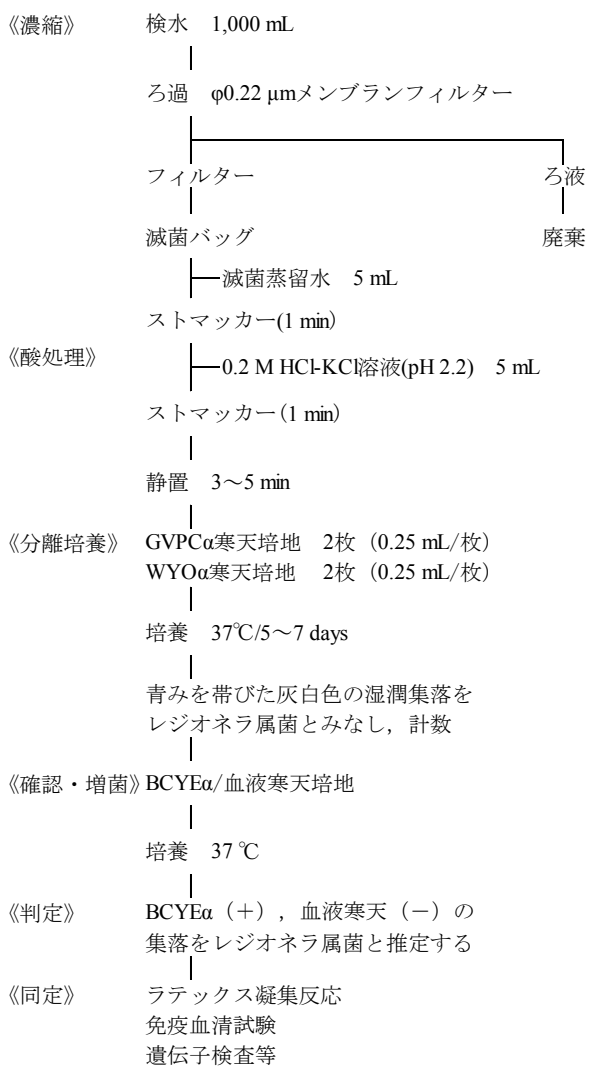


図1. レジオネラ属菌検査（培養法）の流れ

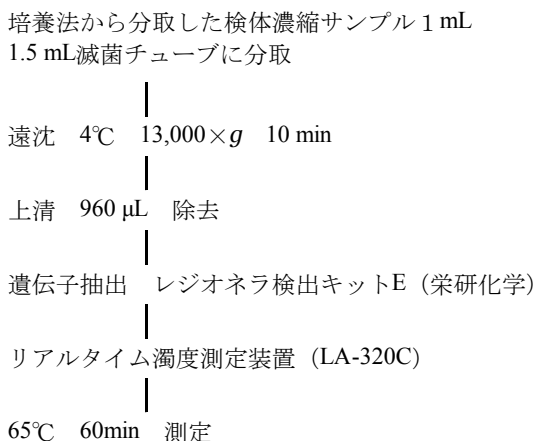


図2. 遺伝子検査（LAMP法）の流れ

所) 2枚に各0.25 mLずつ (計1 mL) 塗布し, 37 °Cで5~7 日間培養した. その後, 灰白色の湿潤集落数を計数し, これを羊血液寒天培地/BCYE α 寒天培地 (日研生物医学研究所) に画線培養した. BCYE α 寒天培地のみに発育したものをレジオネラ属菌と推定し, ラテックス凝集反応 (OXID, Legionella Latex Test Kit), 免疫血清反応 (デンカ生研, レジオネラ免疫血清「生研」), およびDNA-DNA ハイブリダイゼーション法 (極東製薬工業 (株), DDHレジオネラ) を適宜組み合わせることで菌種と血清群を決定した. なお, 本法による検出限界は1 CFU/100 mLである.

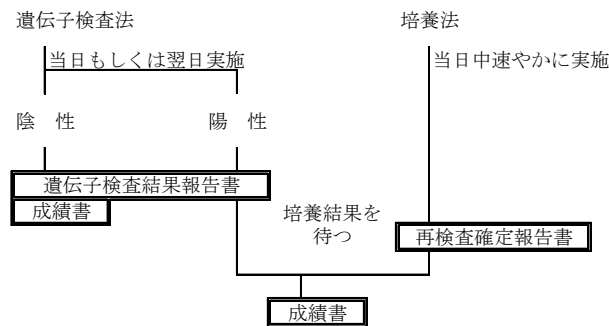
遺伝子検査法は, 図2示すようにLAMP法を用いた. すなわち, 培養法の滅菌精製水洗い出し後の検体濃縮サンプル1 mLを1.5 mL滅菌チューブにいれ, 4°Cで13,000×g, 10 分間冷却遠心し上清960 μLを除去し, これをレジオネラ検出試薬キットE (栄研化学 (株)) を用いて遺伝子抽出し, リアルタイム濁度測定装置 (LA-320C) を用いて, 65°C60 分間測定を行った. 増幅反応時間内に濁度の上昇が認められた場合を陽性と判定した.

3. 改善措置後の再検査への遺伝子検査の適用方法

遺伝子検査を導入した改善措置後の再検査と, その結果の保健所等行政機関へのフィードバックは, 以下のような流れで実施した (図3).

検体搬入後, 培養法は当日中に速やかに開始し, 遺伝子検査法は当日から翌日に行った. 翌日になる場合は, 1.5 mL滅菌チューブに分注したサンプルを冷蔵保管した.

遺伝子検査結果判明後, 陰性の場合は, 案件所管保健所へ速やかに結果報告を行うために, 遺伝子検査結果報告書 (以下, 報告書) と成績書を同時に作成し, 所属長等の承認を経てから, 本庁の所管課 (以下, 所管課) へメールを送信する旨の電話連絡後, メールにて報告書を送信する. その後, 所管課は案件所管保健所へメールを送信する旨を電話連絡し, 報告書をメールで送信する. 成績書は案件所管保健所へ, 写しは所管課へ当センター健康危機管理情報



【報告書連絡手順】

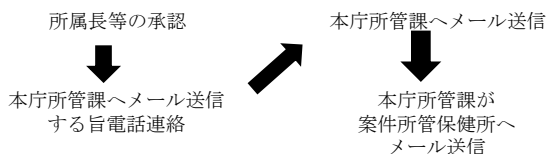


図3. 再検査における遺伝子検査の適用方法

課から郵送で送付する。

遺伝子検査陽性の場合、報告書のみを作成し、遺伝子検査陰性の場合と同様に連絡を行う。ただし、培養法の結果が10 CFU/100 mL未満か否かで行政対応が異なるため、培養法の結果が判明し次第、速やかに、再検査確定報告書を作成し、報告書の場合と同様に連絡を行う。正式な成績書は培養法の結果を待って、遺伝子検査の結果とともに作成し、当センター健康危機管理情報課より郵送にて送付する。

結果及び考察

表1～2に結果を示す。浴槽水の再検査検体150検体中58検体（38.7%）がLAMP法陽性となり、うち9検体から培養法でもレジオネラ属菌が10 CFU/100 mL以上検出された。また、92検体（61.3%）がLAMP法陰性となり、これらはすべて10 CFU/100 mL未満であった。また、プール水では17検体中7検体（41.2%）がLAMP法陽性となったが、培養法で10 CFU/100 mLを超える菌数は検出されず、10検体（58.8%）がLAMP法陰性であり、これらはすべて10 CFU/100 mL未満であった。

このように、浴槽水150検体のうち遺伝子検査結果が陰性であった61.3%（92検体）、及びプール水17検体のうち遺伝子検査結果が陰性であった58.8%（10検体）はすべて条例の運用における「検出されないこと」に該当した。したがって、7～14日かかる培養法を待たずに、保健所は施設に改善措置後の施設の使用を早期に再開させることが可能であった。

一方、LAMP法陽性となった浴槽水58検体中49検体（84.5%）及びプール水7検体すべては、培養法で10 CFU/100 mL未満であった。これらは、条例の運用における「検出されないこと」に該当するものであった。したがって、遺伝子検査によるレジオネラ陽性の場合も条例の運用

表1. 浴槽水におけるレジオネラ属菌検査結果

	LAMP法		
	陽性	陰性	計
培養法			
10 CFU/100 mL以上	9	0	9
10 CFU/100 mL未満	49	92	141
計	58	92	150*

数字は検体数

* 総検体数

表2. プール水におけるレジオネラ属菌検査結果

	LAMP法		
	陽性	陰性	計
培養法			
10 CFU/100 mL以上	0	0	0
10 CFU/100 mL未満	7	10	17
計	7	10	17*

数字は検体数

* 総検体数

上の扱いとの整合性から十分慎重な対応が必要であると考ええる。

ま と め

東京都では、レジオネラ検出施設における改善措置後の再検査は、培養法に加えて、遺伝子検査を実施し、遺伝子検査結果判明後は報告書を作成し、本庁所管課を經由し、保健所へ速やかに連絡を行っている。

再検査として平成23～25年度に当センターに搬入された、浴槽水およびプール水計167検体を検査したところ、102検体61.1%が遺伝子検査陰性となり、そのすべてにおいて培養法で10 CFU/100 mL未満であった。

一方、遺伝子検査陽性であった65検体中、浴槽水の84.5%、プール水すべてにおいて、培養法で10 CFU/100 mL未満であった。

この3か年の結果から、レジオネラ検出施設における再検査に遺伝子検査法を加えることで、遺伝子検査陰性の場合には、施設の使用を早期に再開させることが可能であることが確認されたが、遺伝子検査陽性の場合には条例との整合性を考慮し、慎重な対応が必要であると考えられる。

謝 辞 本調査に供した検体の採水は、東京都環境衛生監視員によって行われたものである。記して関係各位に深謝します。

文 献

- 1) 公衆浴場の設置場所の配置及び衛生措置等の基準に関する条例，昭和39年8月1日東京都条例第184号，平成24年4月1日改正，2012。
- 2) 旅館業法施行条例，昭和32年10月22日東京都条例第64号，平成24年4月1日改正，2012。
- 3) プール等取締条例施行規則，昭和50年3月31日東京都規則第78号，平成19年4月1日改正，2007。
- 4) 東京都福祉保健局健康安全部長：24福保健環第1910号，公衆浴場等におけるレジオネラ属菌検出時の指導等に関する要綱の制定について（通知），2013。

**Re-inspection results by genetic testing of *Legionella*-positive
bath water and pool water (April 2011-March 2014)**

Chieko MUTO^a, Takeshi ISHIKAMI^a, Kumiko KUSUNOKI^a, Megumi ICHIKAWA^a,
Asami TSUJI^a, Yukiko TABELI^a, Mitsugu HOSAKA^a, Dai NAKAE^a

The Tokyo Metropolitan Government's ordinance and regulation regarding sanitation of bath and pool states that *Legionella* bacteria should not be detected in water. In these Tokyo's ordinance and regulation, the term "not detected" actually means that the concentration of *Legionella* bacteria must be less than 10 CFU/100 mL. If *Legionella* bacteria exceed 10 CFU/100 mL in bath or pool water, the Tokyo Metropolitan Government recommends improving sanitation of the facilities. If the bacteria are not detected on re-inspection by the government after the sanitation is improved, it is noted that the recommended improvement has been completed. However, detection of *Legionella* bacteria through cultivation method needs almost 7 to 14 days to obtain the result, therefore, the final judgment of post-improvement re-inspection of water needs a long time. We introduced the LAMP method as a genetic test method for the re-inspection. The government can judge the facility ready to resume immediately when the result of the LAMP method is negative.

A total of 167 water samples (150 samples of bath water and 17 samples of pool water) were examined as re-inspection for *Legionella* bacteria from April 2011 to March 2014. Ninety-two water samples (61.3%) of bath water and 10 water samples (58.8%) of pool water were negative for *Legionella* by the genetic test. They also fulfilled the ordinance as the concentrations of *Legionella* bacteria in them were less than 10 CFU/100 mL. Due to this, the Health Centers could allow the facility to resume without waiting for the result of the cultivation method.

Fifty-eight water samples of bath water and 7 samples of pool water were positive for *Legionella* by the genetic test. However, 49 samples of the bath water and all samples of pool water contained less than 10 CFU/100 mL of *Legionella* bacteria. These samples also fulfill the requirement of the ordinance. Thus, in case of *Legionella* detected through the genetic test, it is necessary to interpret carefully whether the water sample fitted the ordinances and regulations or not.

Keywords: Legionella, bath water, pool water, the LAMP method

^a Tokyo Metropolitan Institute of Public Health,
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan